# 家蚕精巢蛋白质的双向电泳及质谱分析

聂红毅，钟晓武，邹 勇，衣启营，赵 萍*，夏庆友
（西南大学蚕学与系统生物学研究所，农业部蚕学重点开放实验室，重庆 400716）

**摘要**：精巢是雄性家蚕 *Bombyx mori* 的生殖腺，它的主要功能是产生精子，全面检测和鉴定精巢器官的蛋白分布将为分析家蚕雄性个体的发育和繁殖奠定基础。本研究利用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白硝酸银染色技术对家蚕 5 龄第 5 天幼虫的精巢组织进行了蛋白检测，利用基质辅助激光解析质量飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)对表达量较高的蛋白点进行了肽质量指纹图谱鉴定。结果表明：家蚕精巢蛋白质可以检测出 1 000 个以上的蛋白点，这些蛋白点主要集中在分子量为 15 ~90 kD 区域，等电点 3.5 ~9 之间，其中 60 个蛋白点得到了成功鉴定，按照已知或推测的蛋白功能，将其分为 8 类，包括：细胞骨架和细胞结构蛋白，膜蛋白或信号相关蛋白，大量应激反应蛋白(伴侣蛋白)，线粒体和能量产生相关蛋白，转录调控和翻译及 DNA/RNA 结合相关蛋白，酶和少量血液组成蛋白。其中很多蛋白可能在鞭毛形成、能量代谢及减数分裂过程中有重要作用。这些结果为进一步认识家蚕精子形成过程提供了重要的生物学信息。

**关键词**：家蚕；精巢；精子形成；蛋白质；双向电泳；肽质量指纹图谱鉴定；质谱分析；生物信息学分析
**中图分类号**：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2010)04-0369-10

# Identification of testis proteins of silkworm *Bombyx mori* using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry

NIE Hong-Yi, ZHONG Xiao-Wu, ZOU Yong, YI Qi-Ying, ZHAO Ping*, XIA Qing-You (The Key Sericulture Laboratory of Agricultural Ministry, Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract**: Testis is the generative gland in silkworm *Bombyx mori* that produces spermatozoa. A complete understanding of proteins expressed in the testis will provide biological information on development and reproduction in males of the silkworm. We investigated the testis proteins of 5th instar day-5 larvae of the silkworm using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining, followed by computer-assisted analysis. Then, the matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry was applied to identify the major protein spots of the 2D map with peptide mass fingerprinting data. The results showed that over 1 000 spots were obtained by silver staining. The profiles of silkworm tissue proteins were established in a pI range of 3.5 - 9 and a molecular mass range of 15 kD to 90 kD. Among them, 60 proteins were identified successfully, which were divided into 8 groups according to their known or putative functions, including cytoskeleton and cell structure (cell differentiation), membrane protein receptors or cell signaling related, stress response (chaperones), mitochondrial and energy production related, translational and transcriptional regulation or DNA/RNA binding related, enzymes and blood components. Many proteins play important roles in flagellar formation, energy metabolism and meiosis. These results may provide valuable biological information for investigating spermiogenesis in the silkworm.

**Key words**: *Bombyx mori*; testis; spermiogenesis; proteins; 2D-electrophoresis; peptide mass fingerprinting; mass spectrometry; bioinformatical analysis

---

基金项目：国家科技部“973”计划项目(2005CB121000)；国家科技部“863”计划项目(2006AA10A117)；国家教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队(IRT0750)；国家自然科学基金项目(30972147)
作者简介：聂红毅，男，1983 年生，河南三门峡人，硕士研究生，研究方向为蛋白质组学与酶工程，E-mail：hnhynie@126.com
*通讯作者 Corresponding author, E-mail：zhaop@swu.edu.cn
收稿日期 Received：2009-12-08；接受日期 Accepted：2010-02-18

精巢的发育是雄性动物生殖系统形成的重要过程，为生物的生殖奠定了结构基础。精巢主要功能是通过睾丸间质细胞合成雄性激素和产生精子(Christensen，1975)。精巢发育的过程包括配子母细胞的形态发生变化(即精子发生)和激素的调控(Desjardins，1978；Berardinelli *et al*.，1984)。家蚕精子的形成可以分为 4 个阶段(吴载德，1991)：Ⅰ，增殖期：蚁蚕精巢内的精原细胞数目很少，每个精巢仅 119.5 个，随着蚕的生长，精原细胞通过有丝分裂的形式迅速增殖，到 3～4 龄，每个睾丸内可达 3 000～4 000 个；Ⅱ，生长期：此期初级精母细胞的体积略微增大，生精囊也随着增大，但精子的生长期极短；Ⅲ，成熟期：该期从 3 龄末到熟蚕，在 3 龄末到 4 龄初这段时间，初级精母细胞开始进行减数分裂，到熟蚕时，初级精母细胞大部分结束成熟分裂；Ⅳ，变形期：该期从熟蚕到蛹期，生成的精细胞逐渐由圆形变成有尾的精子，精子的形状似长线，主要由顶体、头部(含有精囊)、尾部等部分组成。在精巢中有许多蛋白高量表达，包括同工酶(乳糖脱氢酶、细胞色素 C 和蛋白激酶等)、细胞骨架蛋白(微管蛋白、顶体蛋白和组蛋白等)、原癌基因产物(c-raf，ras 和 c-abl 等)、热激蛋白(HSP19.9，HSP70 和 HSP90 等)、环磷酸腺苷调控激酶以及转录因子(Hecht，1993)。这些蛋白在精子发生的过程中发挥着重要作用。

在精子发生的过程中，基因对蛋白质的时空表达以及细胞的分化有很大的影响(Yu *et al*., 2003；Kimmins，2004)。借助于多种不同的技术和先进的仪器，以及一些报道的相关文献和生物信息学的发展，发现越来越多的基因与精子发生相关，这对精巢的研究提供了更多的信息。但是这些信息对于转录后基因表达、蛋白水平的变化或蛋白的修饰不能提供准确的证据。蛋白质组学技术为我们在整体规模鉴定不同组织的蛋白提供有利的工具。整体蛋白组的鉴定可以帮助我们探索基因、环境和蛋白之间的相互关系，加深我们对蛋白功能的了解，对于临床医学和生物学领域有很广阔的应用前景(Blackstock and Weir，1999)。已经报道的有：人类精子蛋白质组(Naaby-Hansen *et al*., 1997)、公马附睾蛋白质组(Fouchecourt *et al*., 2000)、家鼠精原细胞蛋白质组(Guillaume *et al*., 2001)和猪精巢蛋白质组(Huang *et al*., 2005)。最近，利用质谱技术在蜜蜂 *Apis mellifera* 精液中鉴定了 57 个高丰度的蛋白(Baer *et al*., 2009)。这些研究为我们从蛋白水平上阐明精子发育的生物学机制提供了大量数据。

随着家蚕基因组框架图谱和精细图谱相继完成，研究者从转录水平上发现许多与精子发生过程密切相关的基因，然而关于精巢发育过程蛋白质组却报道很少。构建生殖功能组织(如精巢、卵巢)的图谱有助于我们研究关于发育和生殖相关蛋白的作用，本研究采用蛋白质组学的方法构建家蚕 5 龄第 5 天的双向电泳图谱，并分析鉴定其蛋白组成。这些鉴定的蛋白点数据为进一步研究家蚕精子的发育和生殖等方面提供有用的资源。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

家蚕大造(P50)品种，由西南大学家蚕基因库提供。以桑叶添食饲养到 5 龄第 5 天，解剖幼虫，将精巢组织置于冰冷的 Milli-Q 水，迅速放置于离心管中，－80℃保存。

### 1.2　样品组织蛋白质的抽提

取出－80℃低温保存的精巢组织，称取约 0.15 g 于研钵中，加入液氮，迅速研磨至粉状，使精巢组织被充分破碎。待组织溶解后加入裂解缓冲液(8 mol/L urea，4% CHAPS，30 mmol/L DTT，2% IPG buffer)使其充分裂解，在 4℃下静置 1 h，然后在 12 000 g 离心 20 min，吸取上清用 Brandford 法定量蛋白质浓度(Bradford，1976)，然后分装至离心管中－80℃保存备用。

### 1.3　精巢组织的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2-D PAGE)分析

采用 IPGphorIII 等电聚焦系统进行等电聚焦，方法参照 IPGphorIII 说明书进行操作，采用 18 cm (pH 3～10)胶条，上样量为 200 μg。选用梯度升压的方法：50 V 水化 12 h，100 V 1 h，200 V 1 h，1 000 V 30 min，3 000 V 30 min，5 000 V 30 min，8 000 V 100 000 vhr。聚焦完毕后两步平衡法进行平衡，每步 15 min，第一步平衡液为 6 mol/L urea，50 mol/L Tris-HCl，0.07% SDS，30% glycerol，1% DTT，第二步平衡时用 1.25% 碘乙酰胺代替第一步平衡液中的 DTT。采用 Amersham SE400 型垂直电泳设备，胶浓度 12.5%，起始 10 mA/胶进行电泳 1 h，当溴酚蓝完全转移到 SDS-PAGE 凝胶后，加大电流到 50 mA/胶进行电泳，约进行 4～5 h，待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时停止电泳。电泳结

束后，轻轻撬开两层玻璃，取出凝胶，进行硝酸银染色。

### 1.4　双向电泳图谱扫描与分析

凝胶显色过后，用 Image Scanner 扫描仪对双向电泳图进行扫描分析，分辨率设为 300 dpi。采用 Image master 2D 分析软件对双向电泳图谱中的蛋白点进行分析检测，包括蛋白斑点的分子量、等电点预测等。

### 1.5　蛋白点的胶内消化

在 18 cm 银染的双向电泳图谱凝胶中选取较明显的 70 个蛋白点，手工挖点，分别放置于预先用 Milli-Q 水润洗过的离心管中，然后参照文献(Sacchettini and Gordon，1993)中的蛋白点胶内消化方法进行处理。完毕后用 3 μL 50% ACN/5% TFA 重新溶解样品，将 0.5 μL 样品与 0.5 μL 基质液 CHCA(α-氰基-4-羟基肉桂酸)混合后点样于进样板上，置空气中自然凉干。

### 1.6　蛋白质肽质量指纹图谱分析与检索鉴定

采用 Voyager DE Pro 型基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪对处理好的样品进行检测，采用反射模式进行信号收集，加速电压为 20 000 V，离子延迟时间 80 ns，真空度为 $1\times10^{7}$ Torr。收集质荷比范围在 800 ~ 2 000 D 范围内的肽段峰，用胰蛋白酶自切信号作为内标校正。从 SILKDB (ftp：//ftp.genomics.org.cn/pub/SilkDB/Gene_Annotation/Proteins/SW_ge2k_BGF.pep)下载家蚕蛋白质预测数据库，并利用 GPMAW (General Protein/Mass Analysis for Windows)软件(Peri *et al*., 2001)构建家蚕蛋白肽质量指纹数据库。

采用软件 Data explore 对所得到的肽质量指纹图谱进行数据处理分析，再利用 GPMAW 软件在本地蛋白质数据库中进行检索，参数设置如下：精度(precision)为 0.1000%，忍受度(minimum)为 0.50 D，最小匹配数(min hits)为 2，重叠数(overlaps)为 1。同时利用 MASCOT(http：//www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl? FORMVER = 2&SEARCH = PMF)对其检索结果进行验证，确保 GPMAW 软件在本地数据库检索的可靠性。MASCOT 检索参数设定(彭泳波等，2008)：检索数据库为 NCBInr 或 SwissProt，分类(Taxonomy)为全部，酶(Enzyme)为胰蛋白酶，漏切数(miss cleavages)为 1，固定修饰为半胱氨酸的碘乙酰胺化 [carbamidomethyl (C)]，可变修饰为蛋白 N 末端的乙酰化 [acetyl (protein N-terminal)] 和甲硫氨酸的氧化 [oxidation(M)]，忍受度(mass tolerance)为 1.2 D。

### 1.7　生物信息学分析

从家蚕数据库(http：//silkworm.swu.edu.cn/silkdb)中获得鉴定蛋白的 GO 分类号，然后按照 GO 分类的制作方法(Ye *et al*., 2006)提交到 WEGO (http：//wego.genomics.org.cn/)，绘制出蛋白的 GO 分类图。

## 2　结果与分析

### 2.1　家蚕 5 龄第 5 天精巢双向电泳图谱分析

为了分析家蚕精巢的蛋白组成，采用 2-D PAGE 分离样品。按 200 μg 总蛋白上样，用 12.5% SDS-PAGE 电泳和经硝酸银染色后，得到精巢双向电泳图谱(图 1)，蛋白点较为清晰，且 3 次重复性较好。用 Image master 2D 软件分析精巢双向电泳图谱，可以检测到较为明显的点在 1 000 个以上，这些蛋白点主要分布在分子量 15 ~ 90 kD，等电点 pI 3.5 ~ 9 的范围内。

### 2.2　精巢蛋白的 MALDI-TOF MS 质谱分析

将图 1 中较为明显的 70 个蛋白点进行切胶和胰蛋白酶胶内消化处理，然后进行 MALDI-TOF MS 鉴定。结果利用 Date Explorer 软件处理，同时采用 GPMAW 软件和 MASCOT 搜索，并通过家蚕数据库和 NCBI 数据库确认。结果分析表明，有 60 个点的肽指纹图谱的信号峰较好，成功率为 85.7%。以蛋白点 12 为例，可以检测到 14 个明显的肽段峰(图 2，表 1)，信噪比较低，匹配很好。

鉴定结果发现一些不同的蛋白点被鉴定为完全相同或者相似的蛋白，如图 1 和表 2 中：5 和 6 是 β-微管蛋白，9 和 10 是肌动蛋白 A3，43 和 46 是巯基过氧还原蛋白，49 和 50 是热激蛋白 19.9。这可能是由于蛋白等电点(pI)或分子量偏移造成，也可能是蛋白翻译后修饰或蛋白降解所导致的缘故。

运用 Date explorer 和 GPMAW 软件在本地数据库中检索 12 号蛋白点，所提交 14 个肽段信号峰中 13 个与热激蛋白 70 蛋白氨基酸序列匹配，其肽段与数据库中预测蛋白序列匹配率高，得分为 140。用同样方法，成功鉴定 60 个蛋白，这些蛋白的功能、等电点和分子量等如表 2 所示。

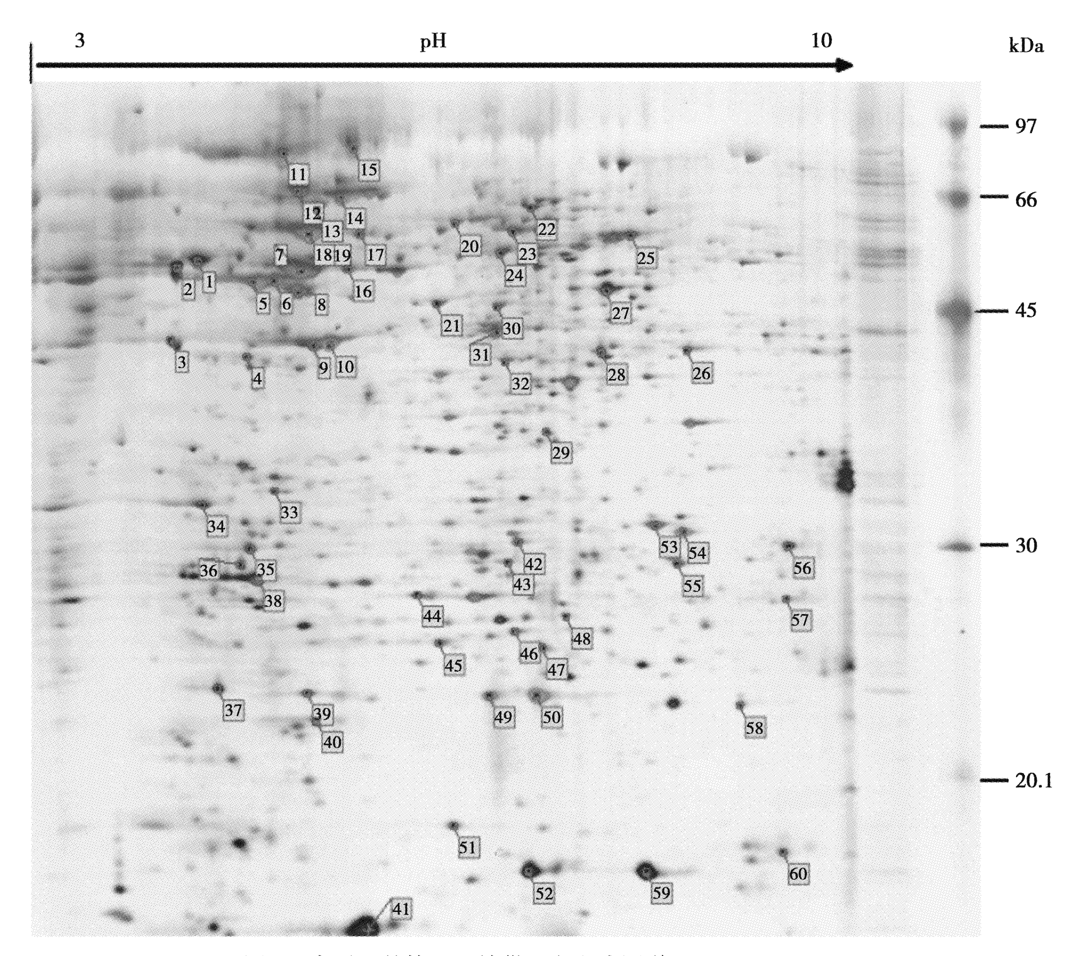



图 1　家蚕 5 龄第 5 天精巢双向电泳图谱(18 cm, pH 3～10)

Fig. 1　Two-dimensional electrophoresis map of testis from 5th instar day-5 larvae of silkworm *Bombyx mori* (18 cm, pH 3–10)

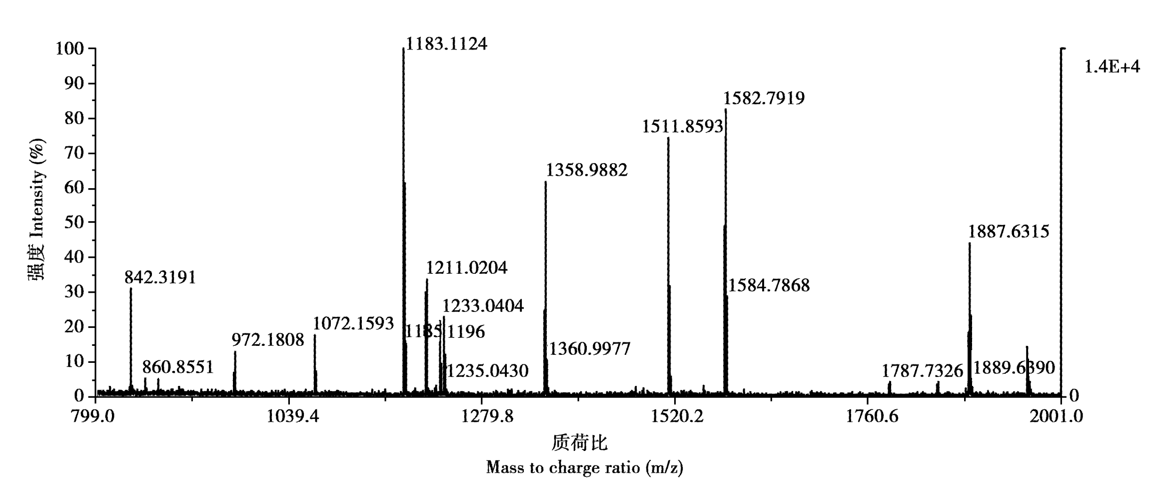



图 2　12 号蛋白点的肽指纹图谱

Fig. 2　Peptide mass fingerprinting of No. 12 protein spot

**表 1 蛋白点 12 的肽段匹配结果**

**Table 1 The match result of No. 12 protein spot**

| 测量值<br>Measured value | 计算值<br>Computed value | 偏差值<br>Difference | 氨基酸残基<br>Amino acid residues | 氨基酸序列<br>Amino acid sequence |
|---|---|---|---|---|
| 972.181 | 972.062 | −0.12 | 535 − 542 | R LTPEDIER M |
| 1 072.162 | 1 072.186 | 0.02 | 526 − 534 | K IVITNDQNR L |
| 1 183.112 | 1 183.372 | 0.26 | 484 − 494 | K FDLTGIPPAPR G |
| 1 210.024 | 1 210.311 | 0.29 | 379 − 388 | K EFFNGKEPSR G |
| 1 211.020 | 1 210.311 | −0.71 | 379 − 388 | K EFFNGKEPSR G |
| 1 228.052 | 1 228.327 | 0.28 | 53 − 63 | R VEIIANDQGNR I |
| 1 233.039 | 1 233.411 | 0.37 | 188 − 199 | K DAGTISGLNVMR I |
| 1 358.989 | 1 359.499 | 0.51 | 357 − 369 | K DVDEIVLVGGSTR I |
| 1 511.859 | 1 512.749 | 0.89 | 327 − 338 | R AKFEELNMDLFR S |
| 1 582.792 | 1 583.717 | 0.93 | 64 − 77 | R ITPSYVAFTQDGER L |
| 1 786.717 | 1 788.073 | 1.36 | 200 − 216 | R IINEPTAAAIAYGLDKK E |
| | 1 787.944 | 1.23 | 561 − 575 | R VESRNELESYAYSIK N |
| 1 846.641 | 1 848.001 | 1.36 | 85 − 100 | K NQLTTNPENTVFDAKR L |
| 1 886.628 | 1 888.113 | 1.49 | 167 − 183 | K VTHAVVTVPAYFNDAQR Q |
| 1 959.635 | 不匹配<br>No match | | | |

**表 2 家蚕 5 龄第 5 天精巢蛋白点质谱鉴定表**

**Table 2 List of proteins identified from testis of 5th instar day-5 larvae of *Bombyx mori***

| 蛋白编号<br>Spot no. | 蛋白名称<br>Protein name | 蛋白功能<br>Protein function | NCBI 编号<br>NCBI entry | 家蚕数据库编号<br>SilkDB entry | 分子量/等电点<br>Mr (kDa)/pI | 覆盖度（%）<br>Coverage |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 蛋白质二硫键异构酶<br>Protein disulfide isomerase | 应激反应<br>Stress response | gi \| 112984454 | BGIBMGA011844 | 56/4.45 | 19.60 |
| 2 | 钙网织蛋白<br>Calreticulin | 钙离子结合活性<br>Calcium ion binding activity | gi \| 28804517 | BGIBMGA000475 | 46/4.34 | 16.80 |
| 3 | DNA 超螺旋因子<br>DNA supercoiling factor | 形成负螺旋<br>Generating negative supercoils | gi \| 112983659 | BGIBMGA001107 | 38/4.34 | 17.10 |
| 4 | 核糖体蛋白 SA<br>Ribosomal protein SA | 形成翻译起始复合物<br>Formation of the translation initiation complex | gi \| 54609281 | BGIBMGA007311 | 33/4.73 | 17.00 |
| 5, 6 | β-微管蛋白<br>Beta-tubulin | 结构分子活性<br>Structural molecule activity | gi \| 112983318 | BGIBMGA009132 | 50/4.6 | 21.30 |
| 7 | α-微管蛋白<br>Alpha-tubulin | 结构分子活性<br>Structural molecule activity | gi \| 112983501 | BGIBMGA002542 | 50/4.83 | 19.30 |
| 8 | $H^+$转运 ATP 合成酶 β 亚基 1 亚型<br>$H^+$ transporting ATP synthase beta subunit isoform 1 | ATP 结合活性<br>ATP binding activity | gi \| 114052072 | BGIBMGA012549 | 55/5.13 | 32.60 |
| 9, 10 | 肌动蛋白 A3<br>Actin A3 | 细胞骨架成分<br>Constituent of cytoskeleton | gi \| 187281837 | BGIBMGA013945 | 42/5.29 | 25.30 |
| 11 | 热激蛋白 90<br>90-kDa heat shock protein | 分子伴侣活性<br>Molecular chaperone activity | gi \| 112983556 | BGIBMGA004612 | 82/4.84 | 14.70 |
| 12 | 热激蛋白 70<br>Heat shock protein 70 | 分子伴侣活性<br>Molecular chaperone activity | gi \| 113676411 | BGIBMGA004614 | 73/4.98 | 26.30 |
| 13 | 空泡 ATP 合成酶催化亚基 A<br>Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A | 形成 $H^+$梯度<br>Building up of a $H^+$ gradient | gi \| 148298878 | BGIBMGA008295 | 68/5.13 | 26.40 |
| 14 | 热激蛋白同源体<br>Heat shock cognate protein | 分子伴侣活性<br>Molecular chaperone activity | gi \| 112982828 | BGIBMGA002381 | 71/5.19 | 17.40 |

**续表 2 Table 2 continued**

| 蛋白编号<br>Spot no. | 蛋白名称<br>Protein name | 蛋白功能<br>Protein function | NCBI 编号<br>NCBI entry | 家蚕数据库编号<br>SilkDB entry | 分子量/等电点<br>Mr (kDa)/pI | 覆盖度(%)<br>Coverage |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 15 | 过渡性内质网 ATP 酶 TER94<br>Transitional endoplasmic reticulum ATPase TER94 | 细胞活性<br>Cellular activities | gi丨112983322 | BGIBMGA003985 | 89/5.17 | 12.30 |
| 16 | 空泡 ATP 酶 B 亚基<br>Vacuolar ATPase B subunit | 形成 $H^+$ 梯度<br>Building up of a $H^+$ gradient | gi丨190407685 | BGIBMGA002241 | 55/5.20 | 24.50 |
| 17 | 伴侣蛋白<br>Chaperonin | 蛋白折叠<br>Protein folding | gi丨120444903 | BGIBMGA011508 | 59/5.28 | 24.20 |
| 18 | 热激蛋白 60<br>Heat shock protein 60 | 分子伴侣<br>Molecular chaperone | gi丨253993196 | BGIBMGA007349 | 61/5.37 | 15.00 |
| 19 | 蛋白质二硫化异构酶类似蛋白<br>Protein disulfide-isomerase like protein ERp57 | Stress response<br>应激反应 | gi丨112983366 | BGIBMGA003587 | 55/5.17 | 15.00 |
| 20 | GJ23334 | 蛋白折叠<br>Productive folding of proteins | gi丨195389562 | BGIBMGA001406 | 59/5.94 | 23.30 |
| 21 | 烯醇化酶<br>Enolase | 碳水化合物代谢<br>Carbohydrate metabolism | gi丨148298800 | BGIBMGA005493 | 47/5.55 | 38.80 |
| 22 | 热激蛋白 70/90<br>Hsc70/Hsp90-organizing protein | 分子伴侣活性<br>Molecular chaperone activity | gi丨112983280 | BGIBMGA010475 | 62/6.11 | 19.80 |
| 23 | 含 t 多肽复合物 1 的伴侣蛋白 β 亚基<br>Chaperonin containing t-complex polypeptide 1 beta subunit | 蛋白折叠<br>Folding of proteins | gi丨114051313 | BGIBMGA001206 | 58/6.33 | 30.40 |
| 24 | 线粒体醛脱氢酶<br>Mitochondrial aldehyde dehydrogenase | 醛脱氢酶家族<br>Aldehyde dehydrogenase family | gi丨114052408 | BGIBMGA010403 | 56/8.54 | 16.80 |
| 25 | 含 TCP1 伴侣蛋白 7 亚基<br>Chaperonin containing TCP1, subunit 7 | 螯合非天然蛋白/促进蛋白折叠<br>Sequesterring nonnative proteins/ promoting folding | gi丨218749822 | BGIBMGA012182 | 50/7.91 | 17.70 |
| 26 | 乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶<br>Acetoacetyl-CoA thiolase | 合成乙酰辅酶 A<br>Synthesis of acetoacyl-CoA | gi丨153791621 | BGIBMGA011029 | 43/9.25 | 20.50 |
| 27 | 成虫原基生长因子<br>Imaginal disk growth factor | 几丁质酶失去催化活性<br>Abolish chitinase catalytic activity | gi丨152061158 | BGIBMGA000648 | 48/8.5 | 21.00 |
| 28 | 类似 CG9331-PB 的 B 亚型<br>Similar to CG9331-PB, isoform B | 能量产生和转化/辅酶代谢<br>Energy production and conversion/ coenzyme metabolism | gi丨66521471 | BGIBMGA009043 | 37/8.83 | 20.40 |
| 29 | 细胞溶质苹果酸脱氢酶<br>Cytosolic malate dehydrogenase | 降低丙酮酸盐的羧基化<br>Reductive carboxylation of pyruvate | gi丨114052561 | BGIBMGA010423 | 35/7.66 | 20.20 |
| 30 | 类似假设的磷酸甘油酸酯激酶<br>Similar to putative phosphoglycerate kinase | 单体酶<br>Monomeric enzyme | gi丨91084675 | BGIBMGA007681 | 45/5.06 | 26.20 |
| 31 | 鸟氨酸氨基转移酶<br>Ornithine aminotransferase | 转氨作用或脱羧作用<br>Transamination or decarboxylation | gi丨157109474 | BGIBMGA003564 | 45/6.4 | 22.10 |
| 32 | 精氨酸激酶<br>Arginine kinase | 维持 ATP 水平<br>Maintenance of ATP levels | gi丨112983926 | BGIBMGA005812 | 40/5.84 | 20.60 |
| 33 | 类似 AGAP003398-PA<br>Similar to AGAP003398-PA | 无机焦磷酸酶<br>Inorganic pyrophosphatase | gi丨91076252 | BGIBMGA007988 | 32/4.81 | 25.00 |
| 34 | 14-3-3ε 蛋白<br>14-3-3 epsilon protein | 分子转换器<br>Molecular adaptor | gi丨148298752 | BGIBMGA013201 | 30/4.51 | 37.80 |
| 35 | 14-3-3ζ 蛋白<br>14-3-3 zeta protein | 分子转换器<br>Molecular adaptor | gi丨114050901 | BGIBMGA002644 | 28/4.75 | 38.50 |
| 36 | Calcyphosphine 2 亚型<br>Calcyphosphine isoform 2 | 钙传感器和钙信号调节器<br>Calcium sensors and calcium signal modulators | gi丨95102740 | BGIBMGA000232 | 25/4.78 | 22.20 |
| 37 | 翻译控制肿瘤蛋白<br>Translationally controlled tumor protein | 翻译控制肿瘤超家族<br>TCTP super-family | gi丨112982880 | BGIBMGA003073 | 20/4.51 | 19.20 |
| 38 | 类似泛素碳末端水解酶 CG4265-PA<br>Similar to ubiquitin carboxy-terminal hydrolaseCG4265-PA | 泛素碳末端水解酶 1 家族<br>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, family 1 | gi丨91079574 | BGIBMGA002640 | 25/4.87 | 17.40 |
| 39 | GJ21531 | 生理过程<br>Physiological processes | gi丨195381197 | BGIBMGA011357 | 20/5.15 | 18.40 |
| 40 | 小分子热激蛋白 19.8<br>19.8 kDa small heat shock protein | 分子伴侣<br>Molecular chaperone | gi丨70905470 | BGIBMGA005784 | 20/5.19 | 23.00 |

**续表 2 Table 2 continued**

| 蛋白编号 Spot no. | 蛋白名称 Protein name | 蛋白功能 Protein function | NCBI 编号 NCBI entry | 家蚕数据库编号 SilkDB entry | 分子量/等电点 Mr (kDa)/pI | 覆盖度(%) Coverage |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 41 | 细胞视黄酸结合蛋白 Cellular retinoic acid binding protein | 脂质运载蛋白 Lipocalin | gi丨112983600 | BGIBMGA013111 | 15/5.53 | 43.20 |
| 42 | 免疫相关 Hdd13 Immune-related Hdd13 | 免疫相关蛋白 Immune-related protein | gi丨4090968 | BGIBMGA013098 | 28/6.93 | 36.10 |
| 43, 46 | 巯基过氧化物酶 Thiol peroxiredoxin | 生理抗氧化剂 Physiological antioxidant | gi丨112982996 | BGIBMGA002186 | 22/6.11 | 27.70 |
| 44 | 热激蛋白 21.4 Heat shock protein hsp21.4 | 蛋白折叠 Protein folding | gi丨112983414 | BGIBMGA000944 | 21/5.75 | 24.10 |
| 45 | 热激蛋白 20.8 Heat shock protein hsp20.8 | 分子伴侣 Molecular chaperone | gi丨148298693 | | 21/5.97 | 25.80 |
| 47 | 热激蛋白 20.4 Heat shock protein hsp20.4 | 分子伴侣 Molecular chaperone | gi丨112983152 | BGIBMGA004541 | 20/6.65 | 39.80 |
| 48 | 类似 HSPC049 Similar to HSPC049 protein | 信号传导 Signal transduction | gi丨156538523 | BGIBMGA004134 | 29/5.87 | 33.10 |
| 49, 50 | 热激蛋白 19.9 Heat shock protein hsp 19.9 | 分子伴侣 Molecular chaperone | gi丨112983420 | BGIBMGA004540 | 20/6.65 | 22.00 |
| 51 | 肌动蛋白解聚因子 1 Actin-depolymerizing factor 1 | 增强肌动蛋白的周转率 Enhancing the turnover rate of actin | gi丨153792659 | BGIBMGA000129 | 17/6.2 | 22.30 |
| 52 | 异常翅圆盘状蛋白 Abnormal wing disc-like protein | NDP 激酶结构域 NDP kinase domains | gi丨153791847 | BGIBMGA007701 | 17/7.67 | 24.70 |
| 53 | 类似电压依赖阴离子选择通道亚型 1 Similar to voltage-dependent anion-selective channel isoform 1 | 调节阴离子流量代谢 Regulating the flux of anionic metabolites | gi丨91088621 | BGIBMGA008955 | 30/7.7 | 30.10 |
| 54 | 低分子量 30 kD 脂蛋白 19G1 Low molecular mass 30 kD lipoprotein 19G1 | 家蚕主要血浆蛋白 Major plasma protein of *Bombyx mori* | gi丨225905554 | BGIBMGA004397 | 29/8.65 | 28.10 |
| 55 | 烯醇基辅酶 A 水解酶前体 3 Enoyl-CoA hydratase precursor 3 | 脂肪酸代谢 Fatty acid metabolism | gi丨87248113 | BGIBMGA005656 | 30/9.28 | 19.60 |
| 56 | 电子传递黄素蛋白 Electron-transfer-flavoprotein beta polypeptide | 电子受体 Electron acceptor | gi丨114053151 | BGIBMGA004824 | 27/9.19 | 28.50 |
| 57 | 短链脱氢酶/还原酶 Short-chain dehydrogenease/reductase | Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins | gi丨114050771 | BGIBMGA001323 | 27/9.47 | 50.40 |
| 58 | 胶转蛋白 Transgelin | 钙调理蛋白结构域 Calponin homology domain | gi丨114051357 | BGIBMGA007092 | 21/9.35 | 31.40 |
| 59 | 亲环素 A Cyclophilin A | 加速蛋白折叠 Accelerates protein folding | gi丨112983782 | BGIBMGA002429 | 18/9.09 | 48.50 |
| 60 | 载脂蛋白Ⅲ前体 Apolipophorin-III precursor | 转运蛋白 Transportation protein | gi丨112983018 | BGIBMGA013108 | 21/9.66 | 39.80 |

### 2.3　精巢鉴定蛋白的功能分类

为了更好地描述家蚕精巢蛋白的鉴定结果，根据蛋白功能将其分为 8 类(表 3)。在这些蛋白中 10% 是细胞骨架和细胞结构蛋白，包括 a-微管蛋白、β-微管蛋白、肌动蛋白 A3 和胶转蛋白。膜蛋白受体和细胞信号相关蛋白占中鉴定蛋白 8.3%，包括钙网蛋白、14-3-3-ε、14-3-3-ζ、Calcyphosphine isoform 2 和 HSPC049 相似蛋白。应激反应蛋白包括大量热激蛋白(HSP90、HSP70 同源体、HSP60 、HSP20.8、HSP19.9 等)、伴侣蛋白和蛋白质二硫化异构酶，占鉴定蛋白的 30%。与线粒体和能量产生相关的蛋白(11.7%)包括 $H^+$ 转运 ATP 合酶 β 亚基 1、空泡 ATP 合酶催化 A 亚基、内质网 ATP 酶 TER94、空泡 ATP 酶 B 亚基、线粒体醛脱氢酶、类似 CG9331-PB B 亚基和精氨酸激酶。转录调控和翻译及 DNA/RNA 结合相关蛋白，如 DNA 超螺旋因子、核糖体蛋白 SA 和翻译控制肿瘤蛋白，占总蛋白 5%。酶类占总蛋白的 15%，分别是烯醇酶、乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、细胞溶质苹果酸脱氢酶、类似假设磷酸甘油酸酯激酶、鸟氨酸转氨酶、类似 AGAP003398-PA、类似泛素碳末端水解酶 CG4265-PA、烯醇基辅酶 A 水解酶前体 3 和短链脱氢酶/还原酶。在所有鉴定的蛋白中，低分子量 30 kD 脂蛋白和载脂蛋白 III 前体两个蛋白来源于血液，占 3.3%。其余 16.7% 蛋白包括成虫圆盘生长因子、细胞视黄酸结合蛋白、免疫相关 Hdd13、巯基过氧化物酶、肌动蛋白解聚因子 1、异常翅圆盘状蛋白、类似电压依赖阴离子

选择通道亚型 1 和电子传递黄素蛋白。

## 2.4 精巢不同蛋白的生物信息学分析

在鉴定的 60 个蛋白中只有 53 个基因找到 GO 分类号，除去 3 个重复基因和 1 个与其他有相同 GO 分类号基因，然后利用 WEGO 对这 49 个蛋白进行分析(图 3)，它们被分为细胞组成、分子功能和生物过程 3 个大类和 31 个亚类，包括营养储存功能蛋白、结合功能蛋白、催化功能蛋白、热应激蛋白及核糖体结构蛋白等；所参与的生物学过程包括代谢、细胞应激、生物合成及免疫等。

**表 3 家蚕精巢蛋白的功能分类表**

**Table 3 Classification of testis proteins from silkworm by functions**

| 功能分类 Function category | 蛋白点数量(个) Number of proteins | 占检测的总蛋白点数的百分比 Percentage of total identified spots |
|---|---|---|
| 细胞骨架和细胞结构(细胞分化) Cytoskeleton and structure (cell differentiation) | 6 | 10 |
| 膜蛋白受体和细胞信号相关 Membrane protein receptor or cell signaling related | 5 | 8.3 |
| 应激反应(伴侣蛋白) Stress response (chaperones) | 18 | 30 |
| 线粒体和能量产生相关 Mitochondrial and energy production related | 7 | 11.7 |
| 转录调控和翻译及 DNA/RNA 结合相关 Translational and transcriptional regulation or DNA/RNA binding related | 3 | 5 |
| 酶 Enzymes | 9 | 15 |
| 血液组成 Blood components | 2 | 3.3 |
| 其他 Others | 10 | 16.7 |

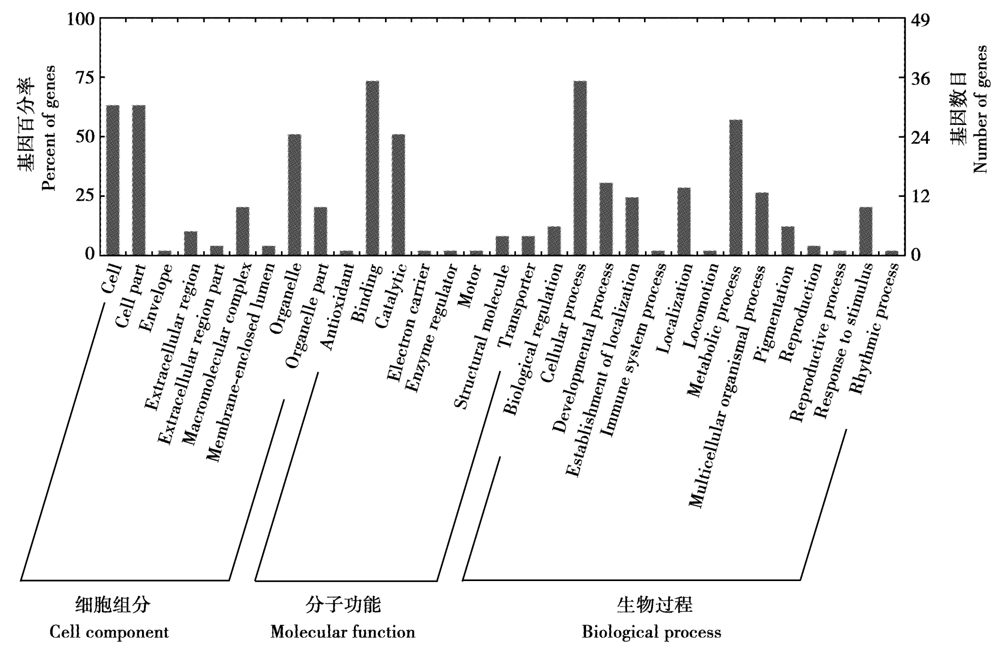



图 3 精巢中不同表达蛋白的 GO 分类图

Fig. 3 Classification of the differentially expressed proteins in testis tissue

# 3 讨论

家蚕精子鞭毛为 9+2 型，即由 9 个二联微管和一对中央微管构成，其中二联微管由 AB 两个管组成，A 管由 13 条原纤维组成，B 管由 10 条原纤维组成，两者共用 3 条。在家蚕初级精母细胞时

期，中心粒开始形成鞭毛，当进入变形期时，随着细胞的伸长，鞭毛伸长变成轴丝。而 5 龄第 5 天时，家蚕处于成熟期，鉴定的 α-微管蛋白和 β-微管蛋白通过二聚体线性排列形成大量的原纤维组成鞭毛，同时为变形期轴丝的伸长提供原材料。鞭毛是精子的运动器官，其他昆虫精子鞭毛内的能量产生途径是线粒体内腔的三羧酸循环途径和轴丝内腔的糖酵解途径（谭六谦，1989）。而在鉴定的蛋白中，我们检测到三羧酸循环的苹果酸脱氢酶和糖酵解途径中的烯醇化酶，说明家蚕精子鞭毛内有相同的能量代谢途径。同时我们还发现大量与线粒体和能量合成相关的蛋白，如 $H^+$转运 ATP 合酶 β 亚基 1、空泡 ATP 合酶催化 A 亚基和空泡 ATP 酶 B 亚基，这些蛋白可能为鞭毛运动提供能量，使精子依靠鞭毛运动沿输精管向下移动进入贮精囊，并通过射精作用将精子射入交配囊中，然后再螺旋运动到受精囊中贮存。

在鉴定的精巢蛋白中，有些蛋白在其他物种精巢或精巢细胞中已经报道，如 HSP90，HSP70，HSP60、翻译控制肿瘤蛋白、14-3-3ε 和 14-3-3ζ。通常条件下，热激蛋白促进细胞间蛋白的运输、新合成蛋白的折叠和过剩蛋白或不稳定蛋白的降解（Beckmann *et al*., 1990），同时在精子形成细胞发育的过程中表达，也对精子发生有非常关键的作用（Sarge and Cullen, 1997; Neuer *et al*., 2000）。在鼠的精巢中，热激蛋白 70-2（HSP70-2）是一种大量表达的发育调控蛋白（Allen *et al*., 1988）。HSP70-2 靶向断裂，导致减数分裂终止、生殖细胞凋亡和雄性不育（Mori *et al*., 1997）。在第一次减数分裂期，HSP70-2 调节细胞分裂周期 2 激酶的活性（Zhu *et al*., 1997），导致在减数分裂前期精母细胞中联会复合体消失（Dix *et al*., 1997）。在家蚕精巢中鉴定的热激蛋白同源体与鼠的 HSP70-2 的同源性为 78%，其是否影响家蚕精子发生和发育需要进一步研究。

翻译控制肿瘤蛋白在人的精原细胞和鼠的生殖母细胞中都有高量的表达，并且在减数分裂的精母细胞和减数分裂后的精子细胞中也有高的表达量，同时，翻译控制肿瘤蛋白在精巢的体细胞中也有表达，在间质细胞和管周细胞表达量较高，而在支持细胞中表达量很低（Guillaume *et al*., 2001）。在家蚕精巢的 mRNA 水平也有较高的表达量，因此，我们推测翻译控制肿瘤蛋白可能在精子发生过程中发挥重要作用。

本研究中我们鉴定出一种广泛分布于真核生物中高度保守的酸性蛋白家族——14-3-3，这类蛋白在细胞周期、细胞凋亡、信号传导、基因转录调控和蛋白运输过程有重要的调控作用。在家蚕的精巢组织中鉴定到 14-3-3ε 和 14-3-3ζ 两种，这两种蛋白在家蚕不同时期和组织广泛分布，并且在 5 龄精巢中有较高的表达量（Kong *et al*., 2007），因此，我们推测家蚕的 14-3-3 可能在精子形成过程中调控基因表达方面有重要作用。

与已报道的家蚕丝腺（Hou *et al*., 2007）、中肠（Kajiwara *et al*., 2005）、血液（Li *et al*., 2006）、脂肪体（Kajiwara *et al*., 2006）、卵巢（Kajiwara *et al*., 2006）双向电泳图谱相比，在家蚕精巢中新鉴定的蛋白有：过渡性内质网 ATP 酶 EFR94、线粒体醛脱氢酶、乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶、鸟氨酸转氨酶、电子传递黄素蛋白、短链脱氢酶/还原酶和转凝蛋白等。这些蛋白在家蚕精巢中的功能，尚需要进一步研究，今后将利用质谱技术和生物信息学手段对精巢发育的目的蛋白进行功能鉴定，阐明其基因的调控机理，深入阐述家蚕精子发育的分子机制。

## 参 考 文 献（References）


Allen RL, O'Brien DA, Eddy EM, 1988. A novel hsp70-like protein (P70) is present in mouse spermatogenic cells. *Molecular and Cellular Biology*, 8(2): 828 – 832.

Baer B, Heazlewood JL, Taylor NL, Eubel H, Millar AH, 2009. The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Proteomics*, 9: 2 085 – 2 097.

Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ, 1990. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science*, 248(4 957): 850 – 854

Berardinelli JG, Allrich RD, Ford JJ, Christenson RK, Anderson LL, 1984. Characterization of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin receptor and its relationships to testicular development and steroidogenesis during sexual maturation in boars. *Biol. Reprod.*, 31: 541 – 547.

Blackstock WP, Weir MP, 1999. Proteomics: Quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology*, 17(3): 121 – 127.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 – 254.

Christensen AK, 1975. Leydig cells. In: Hamilton DW, Gree PRO eds. Handbook of Physiology, Section 7: Endocrinology. Vol. V. Male Reproductive System. American Physiological Society, William & Wilkins, Baltimore. 57 – 94.

Desjardins C, 1978. Endocrine regulation of reproductive development and function in the male. *Journal of Animal Science*, 47(Suppl.

2): 56 – 79.

Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Poorman-Allen P, Mori C, Blizard DR, Brown PB, Goulding EH, Strong BD, Eddy EU, 1997. HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development*, 124(22): 4 595 – 4 603.

Fouchecourt S, Metayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL, 2000. Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of Reproduction*, 62: 1 790 – 1 803.

Guillaume E, Evrard B, Com E, Moertz E, Jegou B, Pineau C, 2001. Proteomic analysis of rat spermatogonia: Reinvestigation of stathmin spatio-temporal expression within the testis. *Molecular Reproduction and Development*, 60: 439 – 445.

Guillaume E, Pineau C, Evrard B, Dupaix A, Moertz E, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Jegou B, 2001. Cellular distribution of translationally controlled tumor protein in rat and human testes. *Proteomics*, 1: 880 – 889.

Hecht NB, 1993. Gene expression during the male germ cell development. In: Desjardins C, Ewing LL eds. Cell and Molecular Biology of the Testis. Oxford University Press, New York. 400 – 432.

Hou Y, Xia QY, Zhao P, Zou Y, Liu HL, Guan J, Gong J, Xiang ZH, 2007. Studies on middle and posterior silk glands of silkworm (*Bombyx mori*) using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 486 – 496.

Huang SY, Lin JH, Chen YH, Chuang CK, Lin EC, Huang MC, Sunny Sun HF, Lee WC, 2005. A reference map and identification of porcine testis proteins using 2-DE and MS. *Proteomics*, 5(16): 4 205 – 4 212.

Kajiwara H, Itou Y, Imamaki A, Nakamura M, Mita K, Ishizaka M, 2005. Protein profile of silkworm midgut of fifth-instar day-3 larvae. *Journal of Electrophoresis*, 49: 61 – 69.

Kajiwara H, Itou Y, Imamaki A, Nakamura M, Mita K, Ishizaka M, 2006. Proteomic analysis of silkworm fat body. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 75: 47 – 56.

Kajiwara H, Nakane K, Piyang J, Imamaki A, Ito Y, Togasaki F, Kotake T, Murai H, Nakamura M, Mita K, Nomura R, Shimizu Y, Shimomura M, Ishizaka M, 2006. Draft of silkworm proteome database. *Journal of Electrophoresis*, 50: 39 – 41.

Kimmins S, Kotaja N, Davidson I, Sassone-Corsi P, 2004. Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction*, 128: 5 – 12.

Kong LY, Lv ZB, Chen J, Nie ZM, Wang D, Shen HD, Wang XD, Wu XF, Zhang YZ, 2007. Expression analysis and tissue distribution of two 14-3-3 proteins in silkworm (*Bombyx mori*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1 770: 1 598 – 1 604.

Lee JM, Kusakabe T, Kawaguchi Y, Miyagawa Y, Takahashi M, Mon H, Nho SK, Koga K, 2004. Molecular cloning and characterization of the translationlly controlled tumor protein gene in *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 139: 35 – 43.

Li XH, Wu XF, Yue WF, Liu JM, Li GL, Miao YG, 2006. Proteomic analysis of the silkworm (*Bombyx mori* L.) hemolymph during developmental stage. *Journal of Proteomic Research*, 5(10): 2 809 – 2 814.

Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S, Shiota K, Eddy EM, 1997. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp70-2 knockout mice. *Developmental Genetics*, 208: 125 – 136.

Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Herr JC, 1997. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 56: 771 – 787.

Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS, 2000. The role of heat shock proteins in reproduction. *Human Reproduction Update*, 6(2): 149 – 159.

Peng YB, Ma YP, Xia YP, Qiu ZY, 2008. Optimization of the method for peptide mass fingerprinting analysis of proteins. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36(4): 467 – 472. [彭咏波, 马永平, 夏永鹏, 邱宗荫, 2008. 肽质量指纹谱鉴定蛋白质时生物信息学分析条件的优化. 分析化学, 36(4): 467 – 472]

Peri S, Steen H, Pandey A, 2001. GPMAW – a software tool for analyzing proteins and peptides. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(11): 687 – 689.

Sacchettini JC, Gordon JI, 1993. Rat intestinanl fatty acid binding protein. A model system for analyzing the forces that can bind fatty acids to proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25): 18 399 – 18 402.

Sarge KD, Cullen KE, 1997. Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53: 191 – 197.

Tan LQ, 1989. Insect Physiology. Shaanxi Scientech Press, Xi'an. 240 – 266. [谭六谦, 1989. 昆虫生理. 西安: 陕西科学技术出版社. 240 – 266]

Wu ZD, 1991. Anatomy and Physiology of Silkworm. Agriculture Press, Beijing. 213 – 223. [吴载德, 1991. 蚕体解剖生理学. 北京: 农业出版社. 213 – 223]

Ye J, Fang L, Zheng HK, Zhang Y, Chen J, Zhang ZJ, Wang J, Li ST, Li RQ, Bolund L, Wang J, 2006. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Research*, 34: W293 – W297.

Yu Z, Guo R, Ge Y, Ma J, Guan J, Li S, Sun X, Xue S, Han D, 2003. Gene expression profiles in different stages of mouse spermatogenic cells during spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 69: 37 – 47.

Zhu D, Dix DJ, Eddy, EM, 1997. HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development*, 124(15): 3 007 – 3 014.

(责任编辑: 赵利辉)